

PCT/JP97/06740

日 本 国 特 許 庁

14.04.97

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 16 JUN 1997	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1996年 3月10日

出 願 番 号
Application Number:

平成 8年特許願第080702号

出 願 人
Applicant (s):

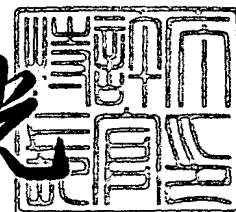
明治乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 5月30日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3040828

【書類名】 特許願

【整理番号】 M1-803

【提出日】 平成 8年 3月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 13/00

【発明の名称】 スギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有効な多重エピ
トープペプチド

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地明治乳業株式会社ヘル
スサイエンス研究所内

【氏名】 曾根 敏雄

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地明治乳業株式会社ヘル
スサイエンス研究所内

【氏名】 桑 晃智

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地明治乳業株式会社ヘル
スサイエンス研究所内

【氏名】 紀 光助

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代表者】 中山 悠

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

特平 8-080702

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9600629

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 スギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有効な多重エピトープペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スギ花粉アレルゲンCry j 1の少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、かつ、図1のペプチド番号1、2、3、4、5、8、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25、27、30、31、32、33、38、39、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68及び69で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は当該ペプチドのアミノ酸配列の一部を有するペプチドからなる群より選ばれた少なくとも一つのペプチド領域と；

スギ花粉アレルゲンCry j 2の少なくとも一つのT細胞エピトープを含み、かつ、図2のペプチド番号1、4、5、6、7、8、9、10、14、15、16、17、18、22、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、37、38、41、42、44、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、60、61、63、64、65、66、68、69、70、71、72、73及び74で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は当該ペプチドのアミノ酸配列の一部を有するペプチドからなる群より選ばれた少なくとも一つのペプチド領域；

とを含む、多重エピトープペプチド。

【請求項2】 Cry j 1の少なくとも一つのペプチド領域が図1のペプチド番号4、14、17、19、22、23、43、61及び64で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は当該ペプチドのアミノ酸配列の一部を有するペプチドからなる群より選ばれたペプチドであり、

Cry j 2の少なくとも一つのペプチド領域が図2のペプチド番号14、17、29、30、38、48、68、70及び71で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は当該ペプチドのアミノ酸配列の一部を有するペプチドからなる群より選ばれたペプチド；

である、請求項1記載の多重エピトープペプチド。

【請求項3】 以下のアミノ酸配列を少なくとも1つ含む、請求項1に記載の多重エピトープペプチド；MKVTVAFNQFGPNRR、VFIKRVSNVIIHGRR、IDIFASKNFHLQ KNTIGTGRR、ISLKLTSKGKIASRRまたはVDGIIAAYQNPASWK。

【請求項4】 複数のエピトープが同一分子上に存在する、請求項1記載の多重エピトープペプチド。

【請求項5】 各エピトープを含むペプチド領域の間に、生体内で切断される領域が介在している、請求項4記載の多重エピトープペプチド。

【請求項6】 生体内で切断される領域がアルギニンダイマーである、請求項5記載の多重エピトープペプチド。

【請求項7】 複数のエピトープが異なる分子上に存在する、請求項1記載の多重エピトープペプチド。

【請求項8】 1つの分子が1つのエピトープを含んでいる、請求項7記載の多重エピトープペプチド。

【請求項9】 HLAクラスII拘束分子DRB5*0101、DRB4*0101、DQB1*0602、DPB1*0501またはDPB1*0201と結合するCry j 1及び／又はCry j 2由来のエピトープを少なくとも1つ含む、多重エピトープペプチド。

【請求項10】 スギ花粉アレルゲンCry j 1及びCry j 2に対する特異的な免疫グロブリンIgEと反応しない、請求項1～9のいずれかに記載の多重エピトープペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】

ヒノキやスギ花粉症などに代表されるI型アレルギー疾患はくしゃみ、鼻水、鼻づまり、目のかゆみなどの症状を示し、患者にとっては大変苦痛な病気である。

【0002】

治療・予防法としては、従来、原因アレルゲンとの接触を避ける抗原回避、抗ヒスタミン剤で代表される薬物療法、標準アレルゲンエキスによる減感作療法な

どが行われる。しかしながら、抗原回避は実施困難であり、薬物療法はあくまでも対症療法である。減感作療法は、その療法の特徴から唯一アレルギーの根本治療を期待できる療法であり、喘息などの治療では成功例が多く見られるが、スギ花粉症に対しては、使用する抗原をスギ花粉から抽出しており、患者IgE抗体と反応するエピトープを含むので、アナフィラキシーなどの副作用が発生し、有効率も小さい。最近、アレルゲン分子上のT細胞エピトープやB細胞エピトープが同定できるようになり、T細胞エピトープを含むペプチドを用いたペプチド免疫療法が新たなアレルギー治療方法として試みられるようになりつつある。

【0003】

I型アレルギー（単にアレルギーという）疾患発症には、HLAクラスII抗原のヒトの間での個体差（多型性）など遺伝的素因をもった免疫反応が背景にあると考えられるが、この素因を持つ者に環境因子が重なって初めて発症に向かう反応が進行すると考えられる。アレルギーの発症のメカニズムは、ターゲットとなる組織によってその発現病態は異なっても基本は共通であり、それは、アレルゲン特異的IgE抗体が肥満細胞や好塩基球の表面に固着し、再度のアレルゲンの侵入により、IgEレセプターがクロスリンクされ細胞が活性化される結果、ヒスタミンなどの化学伝達物質が遊離され、平滑筋収縮により、気道収縮がもたらされ、血管透過性亢進に伴って、鼻汁分泌や蕁麻疹が発生する、といったメカニズムによるとされている。

【0004】

アレルギー発症の引き金となるアレルゲン特異的IgE抗体産生または抑制は、HLAクラスII抗原（DR、DQ、DP）の個体間における高度の遺伝的多型性によって統御される。すなわち、抗原提示細胞内に取込まれたアレルゲンは、タンパク分解酵素によって9~34残基長のペプチド（多くは15mer前後）に分解され、HLAクラスII分子の α 鎖と β 鎖とで形成される多型性に富むペプチド収容溝に適合するものだけがその内部に結合して細胞表面に抗原提示される。

【0005】

この複合体をT細胞レセプターを介して認識したT細胞は活性化され、IL-2、IFN γ などを産生するTh1細胞、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13などを産生するT

h2細胞、またはTh1、Th2細胞のサイトカインを全部産生するTh0細胞の細胞に分化する。Th2細胞から産生されるIL-4やIL-13はIgE産生の誘導活性を示し、また、IL-5及びIL-6はIgE産生の増強活性を示すので、T細胞のTh2細胞の分化及び活性化はアレルギー発症に密接に関係している。

【0006】

すなわち、抗原提示細胞によって提示される抗原ペプチドはHLAクラスII分子のタイプによって拘束されるので、特定の抗原に対するHLAクラスII抗原のタイピングが極めて重要であると考えられる。

【0007】

スギ花粉症とHLAタイプとの相関については、高血清抗Cry j 1 IgE抗体価の患者では、DRB1*1101、DRB1*1201、DPB1*0501、DPB1*1901が、高血清Cry j 2抗体価の患者では、DPB1*0401との正の相関が観察されている[石川哮、アレルギー(1994) 43:1295-1300]。しかし、抗原ペプチドとこれに結合するHLAクラスII分子は同定されていない。

【0008】

近年、分子生物学的手法がアレルギーの基礎研究に取り入れられるようになり、現在100種類以上のアレルゲンのアミノ酸配列が決定されている。さらに、様々なアレルゲンに対して抗原特異的なヒトまたはマウスT細胞株やクローンが樹立されている。また、特異的な組換えDNA技術または固相ペプチド合成を用いて大量のタンパク質抗原又はそのフラグメントを製造することが可能である。このようなことから、患者の末梢血リンパ球、T細胞株またはT細胞クローンを用いて、一次構造の決定された様々なアレルゲン分子上のT細胞エピトープペプチドが同定されている。例えば、ブタクサアレルゲンAmb a 5、Amb t 5、ダニアレルゲンDer p 1、Der p 2、Der f、ネコ皮膚アレルゲンFel d1等について、T細胞エピトープペプチドが同定されている。スギ花粉については、主要アレルゲンCry j 1上のT細胞エピトープが同定されている(WO 94/01560)。更にCry j 1については、当該エピトープを含むペプチドによるスギ花粉症治療組成物が開示されている(WO 94/01560)。

【0009】

一方、Schwartzらは、T細胞クローンに接着分子による共刺激(co-stimulation)のない条件下で、TCRを介する刺激のみを与えると、T細胞はその時点で活性化されないのみならず、長期間(数日～週)にわたって、次に共刺激(co-stimulation)を含む刺激が与えられても活性化されない状態(T細胞アネルギー、T cell anergy)が維持される、ということを明らかにした。

【0010】

T細胞アネルギーを応用したものとして、実験的アレルギー性脊髄炎(EAE)モデルに、主要エピトープ(major epitope/病原性T細胞エピトープ)であるペプチド断片を投与すると、主症状の脊髄麻痺が軽減乃至消失するとの報告がある。これらの知見を受けて、アレルギー疾患に対しても、アレルゲンのT細胞エピトープペプチドを用いた治療が試みられるようになってきた。例えば、ネコの皮膚アレルゲンであるFel d 1のT細胞エピトープを用いて、インビトロでT細胞アネルギーを誘導することができたとの報告がある[Briner, T.J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993)]。

【0011】

このようなペプチドによる減感作療法は、現在ペプチド免疫療法と称されており、その特徴は、1)患者IgE抗体と結合するB細胞エピトープを欠くペプチドを用いることから、従来の粗製または精製アレルゲンによる減感作療法でしばしば発生していたアナフィラキシーなどの副作用が起こり得ない、2)少量から開始し、有効な治療量に到達するのに長期間を要していた減感作療法に比べ、大量のペプチドを一度に投与できるため、短期間の投与で効果が期待できる、などのメリットにある。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

上記したように、HLAクラスII分子の多型性は、アレルゲンに対する免疫応答を統御しており、アレルギー疾患感受性を規定している遺伝的素因の一つとなっていることから、T細胞エピトープペプチドによる有効なペプチド免疫療法を行うには、アレルゲン分子上のT細胞エピトープ部位と結合するHLAクラスII分子を同定する必要がある。しかしながら、スギ花粉の主要アレルゲンCry j 1につい

てはT細胞エピトープペプチドは同定されているが、当該ペプチドを結合し得るHLAクラスII分子のタイプは同定されていない。また、Cry j 2については、T細胞エピトープペプチドを同定したという報告はない。

【0013】

一方、Hashimotoらによれば、スギ花粉症患者145名の90%以上は、スギ花粉アレルゲンCry j 1とCry j 2アレルゲンそれぞれに対する特異的なIgE抗体を持っており、残り10%弱の患者は、Cry j 1又はCry j 2のどちらか一方に対する特異的なIgE抗体のみを持っているとされている [Hashimoto, M. et al. Clin. Exp. Allergy (1995) 25: 848-852]。また、谷口の報告 [谷口美文、アレルギー(1994) 44: 840-841] によれば、スギ花粉症の発症に關与するアレルゲンは、Cry j 1とCry j 2であって、スギ花粉に含まれる他のタンパク質はアレルゲンとしての關与が低いとされている。従って、スギ花粉症の治療としてペプチド免疫療法を試みる場合に、Cry j 1のみ、或いはCry j 2のみのペプチド免疫療法では、患者の90%に対して十分な効果は期待できないこととなる。

【0014】

従って、本発明の目的は、種々のタイプの異なるHLAクラスII分子と結合するCry j 1及びCry j 2由来の抗原ペプチドを含む、スギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有効な多重エピトープペプチドを提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、Cry j 1及びCry j 2のT細胞エピトープと結合するHLAクラスII分子の同定を行い、タイプの異なるHLAクラスII分子と結合するペプチドからなる組成物が、インビトロにおいてT細胞の増殖活性を有しかつ患者IgE抗体と結合せず、インビボにおいてT細胞の増殖活性を抑制することを見出し、本多重エピトープペプチドがスギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有用であることを明らかにし本発明を完成した。

【0016】

本発明は、具体的には、各請求項に記載された発明からなる。

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0018】

【発明の実施の形態】

本明細書において「多重エピトープペプチド」とは、複数（2以上）のエピトープが含まれているペプチドまたはペプチド群を指す。複数のエピトープが同一分子上に存在しても、異なる分子上に存在してもよい。複数のエピトープが同一分子上に存在する際は、該分子内各エピトープを含むペプチド領域の間に、生体内で切断される領域（以下「切断領域」という）を介在させることができる。該切断領域でペプチドが切断させるので、生体内においては、個別のエピトープを含む複数種類のペプチド分子を同時に投与した場合と同等の効果が期待される。なお、該切断領域は、生体内で切断を受ける限りはいかなる構造でもよいが、製造の容易性からアミノ酸であることが好ましく、さらにリソソームに含まれる酵素であるカテプシンBの認識配列であるアルギニンダイマーであることが好ましい。複数のエピトープが異なる分子上に存在する際は、該「異なる分子」は、1つの分子上に複数のエピトープが含まれている分子でも、1つの分子上に1つのエピトープが含まれている分子でもよい。

【0019】

本発明の実施に必要な基礎技術を以下に列挙する。

①スギ花粉抗原の精製

Cry j 1の精製は、安枝らの方法[Yasueda, H. et al. J. Allergy Clin. Immunol. (1983) 71:77-86]で行なう。Cry j 2の精製は、Cry j 2遺伝子（特願平5-276773）を発現ベクターpQE9に挿入し、大腸菌に遺伝子導入した後発現させ、 Ni^{2+} -NTA-アガロースを使用した親和性カラムクロマトグラフィー（Quiagen, Inc. USA）で行なう（Komiyama, N. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 201:1021-1028）。

②オーバーラッピングペプチドの合成

Cry j 1（W094/01560）及びCry j 2（特願平5-276773号に記載）の一次構造を基にし、ペプチド合成装置（島津製作所、モデルPSSM-8）を使用して、Cry j 1またはCry j 2の全一次構造をカバーし、15残基からなる10アミノ酸が重複する

オーバーラッピングペプチドペプチドを、Cry j 1に関しては69種類（図1）、Cry j 2に関しては74種類（図2）合成する。ペプチドは濃度が2mMになるように8M尿素を含むPBSに溶解する。T細胞増殖応答を調査するための培養系にペプチドを添加する場合には、尿素の影響を取り除くために1,000倍以上の希釈倍率で使用する。

【0020】

大腸菌で発現させ、精製を行なった多重エピトープペプチドも、同様に8M尿素を含むPBSに溶解して10mg/mlに調製し、500倍以上の希釈倍率で使用する。

③抗原提示細胞の樹立

スギ花粉症患者由来末梢血から Ficoll-paque（ファルマシア社製）比重遠心法を用いて末梢血リンパ球を分離する。1×10⁶個の末梢血リンパ球にエプステイン・バール（Epstein-Barr／以下ではEBと略す）ウィルスを含むB95-8細胞培養上清を添加して末梢血リンパ球に含まれるB細胞にEB-ウィルスを感染させる。1μg/mlのサイクロスポリンA、20% FCS（ウシ胎児血清）を含むRPMI-1640培養液でおおよそ20日間培養することによって形質転換したB細胞株を樹立する。

④T細胞ライン及びT細胞クローンの樹立

4×10⁶個の末梢血リンパ球を20%ヒト血清を添加したRPMI-1640培養液2 mlに懸濁し、50μg/mlのCry j 1または2～10μg/mlのCry j 2抗原存在下で8日間培養し、Cry j 1またはCry j 2を認識するT細胞を活性化する。

【0021】

T細胞ラインを得る場合には、上記の活性化T細胞が出現した時点で培養液を20 U/mlのIL-2（ペーリンガー／マンハイム社製）、15%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液に置き換え、この培養液を使用しながらさらに14日間培養するところによりCry j 1またはCry j 2を特異的に認識するT細胞ラインを樹立する。

【0022】

T細胞クローンを得る場合には、上記の活性化T細胞が出現した時点で細胞を10cm培養ディッシュに広げ、微量用ピペットで活性化T細胞を1個ずつ選別する。このT細胞1個ずつを前もってマイトマイシンC（協和醗酵社製）処理した自己のEB-ウィルス形質転換細胞（1×10⁵/ウエル）を播種した96-ウエルマイクロ培養プレ

ート上の各ウェルに移す。抗原刺激に準じ、50 $\mu\text{g/ml}$ のCry j 1または2~10 $\mu\text{g/ml}$ のCry j 2をさらに各ウェルに添加した後、7日間培養する。この7日間間隔の抗原刺激をさらに2~3回繰り返すことによりCry j 1またはCry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを樹立することができる。

⑤HLA タイピング

スギ花粉症患者末梢血リンパ球を用い、HLA-クラスIタイピングキット（ベリタス社製）を使用して HLA-クラスIのタイピングを行なう。また、スギ花粉症患者から樹立したB細胞株からDNAを抽出し、第11回国際主要組織適合抗原会議で採用されたPCR-SSO法でHLA-クラスII DNAタイピングを行なう。

【0023】

多重エピトープペプチドの製造については、以下のように行うことができる。

【0024】

患者末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激し、T細胞ラインを作製する。再度、Cry j 1(W094/01560)またはCry j 2(特願平5-276773号に記載)の全一次構造をカバーする15アミノ酸程度のオーバーラッピングペプチドでT細胞ラインを刺激することにより、Cry j 1またはCry j 2分子上でT細胞エピトープペプチド（抗原ペプチド、またはペプチドともいう）として認識されるアミノ酸配列を同定する（図1及び図2）。抗原ペプチドとして認識され得る部位はCry j、Cry j 2ともに分子上の60%にも及ぶが出現頻度の高い抗原ペプチド配列はCry j 1で4箇所（図1のペプチドNo.4、17、22及び43）、Cry j 2で4箇所（図2のペプチドNo.14、38、48及び70）存在している。

【0025】

次に、これら抗原ペプチドと結合するHLAクラスII分子をタイピングする。

【0026】

ヒトの場合、HLAクラスII分子の遺伝子座には、DR、DQ及びDP分子が存在することが知られている。このことは、抗原を提示する抗原提示分子DR、DQ及びDPによりT細胞の分化が規定されている可能性を意味している。そのため、Cry j 1またはCry j 2のT細胞エピトープペプチドがどの遺伝子座由来の抗原提示分子で提示されるのか、また、DR、DQ、またはDP分子を介して抗原ペプチド情報を受け取

ったT細胞は、例えば、Th1またはTh2細胞のどちらに分化しやすい傾向にあるのかを患者毎に樹立したT細胞クローンを用いて決定する（図3、4）。

【0027】

図3、4から抗原ペプチドの刺激後のTh1、Th2またはTh0への分化は特定のエピトープ、特定のHLA分子の組み合わせでは規定されていないことが明らかである。すなわち、本発明の多重エピトープペプチドに使用するペプチドを選定する場合には、最低限T細胞エピトープ部位を含むペプチドであれば、T細胞を刺激することができるため、ペプチド選定の候補となり得る。このような考え方に基づき、多重エピトープペプチドの作製方法を以下に記載する。

【0028】

多重エピトープペプチド作製のためのペプチド選定する基準は、まず重要度指数（図1、2）の高い順番にペプチドを選定すること、日本人集団の中で出現頻度の高いHLAクラスII分子を抗原提示分子としているペプチドを選定することにある。次に、重要度指数があまり差がない場合、有効性を上昇させるために、異なったタイプの拘束分子で提示されるペプチドを選定する。すなわち、抗原提示分子がDR、DQ、DPというように異なる遺伝子座レベル、または遺伝子座が同一でも異なったタイプの抗原提示分子であることが重要である。

【0029】

この際、選定すべきエピトープ部位にシステイン残基が含まれていないことが好ましい。システイン残基がエピトープ部位に含まれていると、HLAクラスII分子に非特異的に結合する可能性があり、システイン残基を含むペプチドで免疫すると、本来は抗原ではない部位が、新たなエピトープとして認識される可能性がある。エピトープとして認識された場合には、2回目、3回目のペプチド投与により、システインを含むエピトープが認識され、副作用が現れる危険性が高くなると予測される。

【0030】

このような選定基準から本発明の多重エピトープペプチドを作製する方法を具体的に示せば以下のようなになる。図1と図2に示したCry j 1とCry j 2の重要度指数を参考にとすると、Cry j 1におけるT細胞エピトープの重要度指数は、ペプチ

ド番号43番のアミノ酸番号211-225（以下p211-225と表示する）（拘束分子 DPA1*0101 - DPB1*0501）が一番高く、ペプチド番号22番p106-120（拘束分子 DRB5*0101）が2番目である。この2者は多重エピトープペプチドに使用する抗原ペプチドとして選定できる。また、Cry j 2における重要度指数は、ペプチド番号14番p66-80（拘束分子 DRB5*0101）と38番p186-190（DRB4*0101）が高く同様に抗原ペプチドとして選定できる。Cry j 2のペプチド番号38番の前に位置するペプチド番号37番p181-195は拘束分子がDPA1*0101 - DPB1*0201であり前記の拘束分子には存在しないタイプの拘束分子である。また、Cry j 2のペプチド番号38番p186-200とは10残基オーバーラップしており、前にペプチド番号37番の5残基を付加すればよい。このエピトープも選定することができる。今まで選定してきた中にはDQ拘束性を示す抗原ペプチドは存在しない。Cry j 1のペプチド番号4番p16-30はDQA1*0102-DQB1*0602が拘束分子であるが、エピトープの中央にシステイン残基が含まれるため選定できない。Cry j 2のペプチド番号69-70番p341-360はDQA1*0102-DQB1*0602 で提示されるペプチドであるが、これも70番にはシステインが含まれている。しかし、システインを含まない69番のペプチドのみでもT細胞を活性化することができるため、12残基のみ、即ちp344-355（ISLKLTSGLIAS）を選定できる。また、Cry j 1のペプチド番号22番p106-120は107番目にシステインを含むが、T細胞クローンを使用したT細胞エピトープのコア配列の決定によって最低必要な配列はp109-117（FIKRVSNI）の9残基である。すなわち、p106-107番目のPro-Cys残基を除去しても使用することができる。

【0031】

抗原提示細胞内に取り込まれた抗原はライソソームで分解される。抗原提示分子に外来性の蛋白質が取り込まれ、どのようにプロセスされ、またどのようにHLAクラスII分子に結合するかは未だに未解決のままである。しかしながら、現在では、この複雑な機構の中で抗原の切断にカテプシンBが関与している可能性が指摘されている【勝沼信彦、日本免疫学会(1995)25:75】。

【0032】

幾つかのHLAクラスIIタイプに関しては、抗原ペプチドの結合モチーフが決定されてきている。結合は特異性を有するが、ある一タイプについても一定の法則

を満たすペプチドであればかなりの種類の抗原ペプチドが結合できる (Rammensee, H.-G. et al. Immunogenetics. (1995) 41:178-228)。このため、抗原ペプチドをつなげた部位に、新たに認識されるエピトープ部位が生ずる可能性がある。そのため、抗原ペプチドごとに抗原提示細胞内で切断されるように多重エピトープペプチドをデザインするのがよいと考えられる。カテプシンBが認識するペプチド配列は、Arg-Arg-疎水性アミノ酸であるため、エピトープを含むペプチドの後半にArg-Arg サイトを付加し、次に続くエピトープ配列は Arg-Arg に続いて疎水性アミノ酸配列が位置するように配置する。

【0033】

抗原ペプチドの配列の順番に関しては、カテプシンBの認識部位で切断されるはずなので順番は問う必要がないため、Cry j 1の重要度指数が高い順番に配列する。また、Cry j 2に関しても基本的にはそれに準ずる。ただし、Cry j 2のペプチド番号14番 (図2) に関しては、このペプチドの後半にArgを接続するとアミノ酸配列はVDGI IAA YQNPASWK-RRとなるが、73番のTyrが第一アンカーとなり、付加したArg残基がDRB5*0101のペプチド結合様式の9番目のアミノ酸となって第二アンカーとなる可能性があり、新たなエピトープとして認識される可能性がある。このため、この配列はArg-Argを付加しないC-末端側に位置するのがよいと考えられる。

【0034】

以上に記載したペプチドの選定基準に基づき作製された本発明の多重エピトープペプチドは、例えば、実施例6で得られる融合ペプチドである。実施例6で得られる融合ペプチドの拘束分子は、DRB4*0101、DRB5*0101、DPB1*0201、DPB1*0501、DQB1*0602である。第11回国際組織適合抗原会議において日本人集団におけるこれらの遺伝子頻度が計算されている (Tsuji, K. et al. HLA 1991 vol. 1 (1992) Oxford University Press)。DRB4*0101は0.291、DRB5*0101は0.056 (DRB5*0102は0.070)、DPB1*0201は0.208、DPB1*0501は0.399、DQB1*0602は0.053 (DQB1*0601は0.204) と算出されている。この値から抗原頻度を計算するとDRB4*0101=0.50、DRB5*0101=0.11 (DRB5*0102=0.14)、DPB1*0201=0.37、DPB1*0501=0.64 (Hori et al.の観察では0.79)、DQB1*0602=0.10 (DQB1*0601=0.37) と計算さ

れる。DRB5*0101とDQB1*0602には連鎖不平衡が存在するため同一とみなせるため、DRB5*0101の値が使用できる。日本人集団でDPB1*0201とDPB1*0501の両タイプの両者または片方を所持する確率は0.85と計算される。また、DRB4*0101とDRB5*0101の両者または片方を所持する確率は0.56と計算される。この値から、実施例6の融合ペプチドに含まれるT細胞エピトープを一箇所以上認識できる患者はおおよそ90%と見積もられる。しかしながら、これらのHLA-タイプを所持する患者においてもT細胞側でこれらの拘束分子で抗原情報が提示されてもこれらのエピトープペプチドを認識できるT細胞レパートリーが存在するかどうかは不明である。また、T細胞の増殖を引き起こすためのエピトープ数が未知である（2箇所以上必要である可能性がある）ため、この融合ペプチドの実際の有効率は下がると考えられる。実際には17名の末梢血リンパ球の増殖応答での結果つまり、77%前後が妥当な値と予測される。

【0035】

本発明のCry j 1及び／又はCry j 2のT細胞エピトープを少なくとも一つ含むペプチドをマウスに皮下投与するとその後のスギ花粉アレルゲンに暴露された場合にT細胞アレルギーを生じさせる（図13、14）。さらに本発明の多重エピトープペプチドは、当該ペプチドを構成する各T細胞エピトープペプチドに対するT細胞クローンのそれぞれを活性化することができ（図10）、かつ患者IgE抗体と反応しない（図8）。T細胞エピトープを含むペプチドで動物を免疫感作した場合、抗原特異的な不応答が誘導され、このことは、合成ペプチドがin vivoにおいて免疫寛容（トレランス）活性を有していることを示している、との報告がいくつかのグループによってなされている [Gaur, A. et al. Science (1992) 258:1491-1494; Romball C. G. et al. J. Exp. Med. (1993) 178: 1637-1644; Briner, T. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993): 7608-7612; Critchfield, J. M. et al. Science (1994) 263: 1139-1143]。これらの文献内容は、本発明の多重エピトープペプチドがスギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有効であることを支持するものである。すなわち本発明の多重エピトープペプチドをヒトなどの哺乳動物に皮下投与すると、対応するT細胞を不応答化またはアレルギー化し、その由来したスギ花粉アレルゲンに対して非応答性となる。その

結果、再度スギ花粉アレルゲンに暴露された場合に免疫応答が生じない。

【0036】

本発明多重エピトープペプチドは、患者由来の末梢血リンパ球、T細胞ラインまたはT細胞クローンの増殖活性を有し、Cry j 1及びCry j 2の少なくとも一つのT細胞エピトープを含む。さらに、Cry j 1及び／又はCry j 2由来の2つまたはそれ以上のペプチドがオーバーラップ領域を共有し、それぞれにT細胞増殖活性が見出されたら、そのようなペプチドの全体または一部のペプチドを作製することができ、作製されたペプチドについて上記のようにT細胞エピトープ部位を決定することができる。

【0037】

本発明多重エピトープペプチドは製薬学的に許容し得る担体または希釈剤と共に投与することができる。その有効量は、スギ花粉アレルゲンに対する感受性の程度、年齢、性別及び患者の体重、並びに患者における免疫応答を引き出すペプチドの能力などの因子に従って変化する。

【0038】

投与経路は、注射（皮下、静脈内）、点鼻、点眼、経口、吸入、経皮などの簡便な方法で投与することができる。

【0039】

【実施例】

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0040】

〔実施例1〕 T細胞ラインを用いたCry j 1及びCry j 2 T細胞エピトープの同定

18名のスギ花粉症患者末梢血リンパ球を、スギ花粉アレルゲンであるCry j 1またはCry j 2で刺激して、各アレルゲンを特異的に認識するT細胞ラインを患者別に樹立した。96-ウエルミクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した 5×10^4 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 2×10^4 個のT細胞ラインを、0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 0.5μ

Ciの ^3H チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに捕集した後、液体シンチレーションカウンターで ^3H チミジンの細胞内取り込みを測定した。ここで「EBVトランスフォームB細胞株を2 mM尿素の存在下で培養したときの ^3H チミジンの細胞内取り込みの値」（基準値）で、上記実験における ^3H チミジンの細胞内取り込みの値を割ることによって得られる値（刺激係数/Stimulation Index）が2以上であった場合には、添加したペプチドが抗原（T細胞エピトープ）として認識されたと定義する。

【0041】

Cry j 1を認識するT細胞ラインを用いたT細胞エピトープ部位の同定により、各患者が認識するT細胞エピトープ部位は、平均9.8でありその範囲は $4 \leq \text{エピトープ数} \leq 15$ であった。他方、Cry j 2では平均8.7であり、その範囲は $2 \leq \text{エピトープ数} \leq 13$ であった。Cry j 1は、353アミノ酸、Cry j 2は379アミノ酸で構成されるため、100アミノ酸残基あたりおおよそ2.3~2.8箇所のT細胞エピトープ部位が存在することになる。HLA-クラスIIタイプは、患者ごとに異なると考えられるため、認識されるT細胞エピトープは、HLA-クラスIIタイプごとに異なると予測される。Cry j 1またはCry j 2分子上に、各患者で認識されるT細胞エピトープ部位を記入する作業を行ない、エピトープマップを作成した。Cry j 1、Cry j 2分子上では、各患者で認識され得るエピトープ部位は異なる。また、アレルゲン分子上では、T細胞エピトープとして認識され易い部位と認識されにくい部位が存在する。また、T細胞エピトープごとにT細胞の増殖率が異なるため、このエピトープマップのみでは、どのエピトープがスギ花粉症の発症に優位に作用しているのかは判定できない。そこで、18名の患者について、刺激係数が2以上であった場合の平均の刺激係数を算出し、この値に出現頻度をかけることによって、エピトープごとの優位性を示す「重要度指数」を算出した。

【0042】

図1と図2にその解析結果を示す。Cry j 1においては、ペプチド番号43番（p 211-225）が重要度指数が679で最高値を示し、ペプチド番号22番の指数は578、ペプチド番号4番の指数は373と続いている。Cry j 2でも同様の解析を行なうと、ペプチド番号14番の指数が709で最高値を示し、ペプチド番号38番の指数が680

、ペプチド番号48の指数が370 と続いている。ペプチド免疫療法を考慮した場合には、重要度指数の高いT細胞エピトープペプチド一つを選定しペプチド免疫療法として使用する方法があるが、出現頻度の最も高い場合でも72%の患者でしか効果が期待できず、実際の有効率はさらに下がるであろう。有効率を上げるためにはいくつかのT細胞エピトープを組み合わせる必要性がある。T細胞エピトープの選定には、重要度指数が最も重要な因子であるが、いくら重要度因子の高いエピトープのみを選択しても、これらのエピトープを抗原として提示する際に作用するHLAクラスII分子が同一であれば有効率を上げることはできない。そのため、T細胞エピトープペプチドを提示するHLAクラスII分子のタイプを同定する必要がある。

【0043】

【実施例2】 T細胞クローンを認識するT細胞エピトープペプチドの同定

18名のスギ花粉症患者の中でCry j 1において高い重要度指数を示すペプチド番号43番と22番を認識する患者2名〔患者B（以下PBと略す）、患者J（PJ）〕とCry j 2において高い重要度指数を示すペプチド番号14番、38番、48番、69番を認識する患者3名〔PB、患者C（PC）、患者R（PR）〕を選定しこれらのスギ花粉症患者の末梢血リンパ球をCry j 1またはCry j 2で刺激してCry j 1またはCry j 2を認識するT細胞クローンを樹立した。4名の患者のHLA-クラスIとクラスIIタイプを以下に示す。

PB: A2/24 - B39/55 - Cw7/w3 - DRB*1501/0901 - DRB4*0101 - DRB5*0101、DQA1*0102/0301 - DQB1*0602/0303 - DPB1*01/01 - DPB1*0501/0201、

PJ: A24/- - B61/51 - Cw3/- - DRB1*1501/0802 - DRB5*0101、DQA1*0102/0401 - DQB1*0602/0402 - DPA1*-/- - DPB1*0501/0402)、

PC: A-2/2 - B54/51 - Cw1/-、DRB1*0405/1501 - DRB4*0101 - DRB5*0101 - DQA1*0301/0102 - DQB1*0401/0602 - DPA1*0202/0202 - DPB1*0201/0501、

PR: A-11/- - B60/35 - Cw7/w3 - DRB1*0901/1501 - DRB4*0101 - DRB5*0101 - DQA1*0301/0102 - DQB1*0303/0602 - DPA1*01/0202 - DPB1*0201/0201)。

【0044】

Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計35

種類、PJ由来末梢血リンパ球から計14種類樹立した。同様に、Cry j 2を特異的に認識するT細胞クローンを、PB由来末梢血リンパ球から計31種類、PC由来末梢血リンパ球から10種類、PR由来末梢血リンパ球から17種類を樹立した。これらのT細胞クローンは全てCD3⁺、CD4⁺、CD8⁻、TCR $\alpha\beta$ ⁺、TCR $\gamma\delta$ ⁻であるため、拘束分子はHLA-クラスII分子であることが判明した。96-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 5×10^4 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 2×10^4 個のT細胞クローンを0, 2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の ^3H チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで ^3H チミジンの細胞内取り込みを測定した。この操作で、各T細胞クローンの認識するT細胞エピトープを同定した。

【0045】

作製したCry j 1を認識するT細胞クローンの中で69% (34/49) はT細胞エピトープを含むペプチド刺激に対して増殖応答を示し、抗原ペプチドを同定できた。同様に、Cry j 2を認識するT細胞クローンの中で、69% (40/58) において抗原ペプチドを同定できた。Cry j 1を特異的に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4、13、19、22、30、31、39、51、66-67番、Cry j 2を特異適に認識するT細胞クローンは、ペプチド番号4-5、8、14、16-17、31、37、38、48、65、66、68、69-70番を認識していた。結果を図3と図4にまとめた。

【0046】

【実施例3】 遺伝子座レベルにおけるHLAクラスII拘束分子の同定

実施例2で樹立したT細胞クローンの増殖応答系に、HLA-クラスII DR、DQ、またはDPに対して特異的に反応する単クローン抗体を添加して、T細胞の増殖応答を阻止することにより、遺伝子座レベルでのHLAクラスII拘束分子を同定した。

【0047】

96-ウエルミクロ培養プレート上で、マイトマイシンC処理した 2×10^4 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗 DR、DQ、またはDP単クローン抗体（バクトン/ディッキンソン社製）、 2×10^4 個のT細胞クローンを、0, 2 mlの15%血清を含むRPMI-1640 培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の

[³H]チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで [³H]チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図5に示す。この図から、Cry j 1 p106-120、Cry j 2 p66-80、Cry j 2 p186-200ペプチドの拘束分子はDR、Cry j 2 p341-355ペプチドの拘束分子はDQ、Cry j 1 p211-225、Cry j 2 p181-195は拘束分子がDPであることがわかる。他のT細胞クローンの拘束分子についても解析した（図3及び図4参照）。

【0048】

【実施例4】 HLAクラスII分子の個々のタイプにおける拘束分子の同定

HLAクラスII遺伝子座レベルでの拘束分子が同定できたT細胞クローンを、DRに、関しては、個々のタイプを遺伝子導入したマウスL-細胞、DQまたはDPに関しては、タイプに関してハプロタイプの一致するB細胞株を抗原提示細胞として用いることにより個々のタイプにおける拘束分子の同定が可能である。

【0049】

96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 5×10^4 個のマウスL-細胞、またはハプロタイプの一致するB細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のオーバーラッピングペプチド、 $3 \mu\text{g/ml}$ の抗DR、DQ、またはDP単クローン抗体（ベクトン/ディッキンソン社製）、 2×10^4 個のT細胞クローンを 0.2 ml の 15%血清を含むRPMI-1640培養液中で2日間培養し、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の [³H]チミジンを添加後さらに18時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに補集した後、液体シンチレーションカウンターで [³H]チミジンの細胞内取り込みを測定した。

【0050】

T細胞クローンの増殖応答が観察された場合に、拘束分子が同定できる。Cry j 1またはCry j 2のエピトープペプチドを認識するT細胞クローンのみを選定して図に示した。Cry j 1 p106-120ペプチドを提示する拘束分子はDRB5*0101、Cry j 1 p211-225ペプチドを提示する拘束分子はDPA1*0101 - DPB1*0501、Cry j 2 p66-80ペプチドを提示する拘束分子は DRB5*0101、Cry j 2 p181-195ペプチドを提示する拘束分子はDPA1*0101 - PDB1*0201、Cry j 2 p186-200ペプチドを提示する拘束分子はDRB4*0101、Cry j 2 p341-355ペプチドを提示する拘束分子はDQA1*

0102 - DQB1*0602であった。他のエピトープ部位についての解析結果は図3及び図4に記載されている。

【0051】

【実施例5】 T細胞クローンのThタイプの同定

アレルギーの発症にはTh2細胞の関与が想定されている。現在の研究レベルでは、抗原刺激後、T細胞のTh1またはTh2細胞への分化が、特定のエピトープペプチドまたはHLA-クラスII遺伝子座レベルで規定されているのかはまだ、未解決な部分が多い。しかし、ペプチドで刺激後、Th2細胞が優位に誘導される場合には、ペプチド投与によりスギ花粉症が悪化する可能性が高い。実施例2で作製したT細胞クローンをT細胞が認識するエピトープペプチドで刺激し、IL-2、IL-4、IFN γ の産生量を測定することによってThタイプを決定した。

【0052】

24-ウエルミクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 1×10^5 個の自己由来B細胞株、 $2 \mu\text{M}$ のエピトープペプチド、 5×10^5 個のT細胞クローンを1mlの10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液中で24時間培養した。遠心で細胞を沈澱させ、培養上清を得た。培養上清中のIL-2、IL-4、IFN γ は市販のELISAキット [IL-2(R&D社製)]、IL-4 (メドジェニックス社製)、IFN γ (大塚アッセイ研究所製)で測定した。

【0053】

各T細胞クローンの産生するIL-2、IL-4、IFN γ 量を図3、図4に示す。Cry j 1を認識するT細胞クローンは、Th2細胞が12、Th1細胞が1、Th0細胞が16であり、Th2がTh1よりも多かったが、Cry j 2を認識するT細胞クローンはTh2細胞が10、Th1細胞が8、Th0細胞が8であり、Th2とTh1とは同程度であった。個々のT細胞クローンの認識するT細胞エピトープ、拘束分子、Thタイプを比較すると、個々のT細胞クローンによってTh2、Th1、Th0タイプは異なり、同一のエピトープ、同一の抗原提示分子を認識する数個のT細胞クローンには、Th2細胞とTh1細胞が見いだされている。これらの結果は、Cry j 1またはCry j 2刺激後のT細胞のTh2、Th1、またはTh0細胞への分化は、特定のT細胞エピトープ、特定の拘束分子の組み合わせでは規定されていないことを意味している。つまり、T細胞エピトープ部位

を含むペプチドは全て、本発明の多重エピトープペプチドの候補となることが判明した。

【0054】

【実施例6】 ペプチド免疫療法組成物の作製

Cry j 1及びCry j 2分子中に存在するIgE抗体エピトープ部位を同定した結果、Cry j 1にはこの一次構造を認識するIgEエピトープは存在しないこと、Cry j 2にはIgE抗体エピトープが少なくとも4ヶ所存在することが明らかとなったが、これらのIgE抗体エピトープ部位は、T細胞エピトープ部位とは異なる部位であった。この知見をもとに、Cry j 1及びCry j 2のT細胞エピトープ部位のうち、図7に示すペプチドを選択した。

【0055】

図7のペプチドa、bはそれぞれ図1のCry j 1のペプチドNo.43、22に対応し、ペプチドcは図2のCry j 2のNo.14に対応し、d、eはそれぞれ図2のCry j 2の37-38及び69-71のアミノ酸の一部からなるものである。

【0056】

これらの6種類のペプチドを直列につなぎ合わせてペプチド免疫療法組成物を作製する場合、2つのペプチドとaとbはa-bの順で固定し残りの3つのペプチド(c、d及びe)をランダムにつなぎ合わせ且つ各ペプチドの間にArg-Argの配列を挿入した融合ペプチドは下記の6種類となる。

- C.A. # 1. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e
- C.A. # 2. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d
- C.A. # 3. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c-Arg-Arg-e
- C.A. # 4. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-d-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c
- C.A. # 5. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-c-Arg-Arg-d
- C.A. # 6. a-Arg-Arg-b-Arg-Arg-e-Arg-Arg-d-Arg-Arg-c

【実施例7】 融合ペプチドのヒトIgE抗体に対する反応性

実施例6で得た6種の融合ペプチド(#1～#6)を0.2M酢酸緩衝液、pH4.5、に溶解させ、0.1ml/ウェルでブラックプレート(大日本製薬)に加えて4℃で一晩放置した。抗原溶液を除去した後、洗浄液で3回洗浄し、29名のスギ花粉患

者及び健常人血清（4倍希釈）を加えて、37℃で4時間反応させた。血清を除去後、洗浄液で3回洗浄し、抗ヒトIgE抗体(Pharmacia)を室温で一晩反応させた。洗浄液で3回洗浄後、0.1mM 4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド / 0.01M リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1M NaCl、1mM MgCl₂、0.1% NaN₃、0.1% BSAの基質溶液を加え、37℃で2時間反応させた。0.1M グリシン/NaOH、pH10.3溶液をこれに加えて反応を停止させ、蛍光分光光度計(Labsystems)で蛍光強度を測定した。なお、各融合ペプチドに対する陽性コントロールとしてビオチン標識ウサギ抗dエピトープIgGとペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ピアス社製)を反応させた。

【0057】

この結果、29名全てのヒト血清は、6種の融合ペプチド（#1～#6）全てについて蛍光強度が3～5であった（ブランク値は3又は4）。これに対してスギ花粉から抽出、精製した抗原であるCry j 1には、蛍光強度1,000以上が6名、100以上が14名、10以上が4名、9以下が5名であった。一方、ウサギ抗dエピトープペプチド（図7参照）IgGは6種のコンセンサスアレルゲンに対して3,000以上を示した（ブランク値は112、Cry j 1アレルゲンには230）。以上のことから、融合ペプチドにおける各エピトープの接続順序はヒトIgE抗体との反応性に影響を与えないことが判明した（図8）。

【0058】

【実施例8】 融合ペプチドのT細胞エピトープの認識の有無

実施例6で得た融合ペプチドのうちC.A.#4（配列は図9に示す、但し図中「/」はリンカーペプチドのアルギニンダイマーを示す）のT細胞エピトープペプチドが実際にT細胞エピトープとして機能しているかについて検討した。

【0059】

96-ウェルマイクロ培養プレート上でマイトマイシンC処理した 5×10^4 個の自己由来B細胞株、 2×10^4 個のT細胞ラインを0.2mlの15%血清を含むRPMI-1640培養液中で、抗原として50 μg/mlのCry j 1、2 μg/mlのCry j 2、各T細胞ラインに対するエピトープを含むペプチド、または遺伝子発現で作製した10 μg/mlの融合ペプチドのいずれかと共に2日間培養し、0.5 μCiの [³H] チミジンを添加後さらに16時

間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに捕集した後、液体シンチレーションカウンターで ^3H チミジンの細胞内取り込みを測定した。結果を図10に示す。

【0060】

Cry j 1 p106-120を認識するT細胞クローンPB8-3、Cry j 1 p211-225を認識するT細胞クローンPB8-34、Cry j 2 p66-80を認識するT細胞クローンPB4-22、Cry j 2 p181-195を認識するT細胞クローンPB14-5、Cry j 2 p186-200を認識するT細胞クローンPB14-34は共に各T細胞ラインに対するエピトープ配列を含むペプチドによく反応している。また、抗原として融合ペプチドを用いても、ペプチドと同様の強さでT細胞が増殖応答している。融合ペプチドに含まれるエピトープは上記5種類に関しては最善の状況で機能していると考えられる。なお、Cry j 2 p341-355を認識するT細胞クローンPB14-19に関しては、融合ペプチド刺激に対してやや弱い増殖応答が観察された。

【0061】

以上の結果は融合ペプチドに含まれるT細胞エピトープを含むペプチドは各々エピトープとして機能し、T細胞を活性化する能力を保持していることを示している。

【0062】

〔実施例9〕 融合ペプチドによるスギ花粉症患者末梢血リンパ球の増殖応答
融合ペプチドはT細胞エピトープ部位を含むため、ペプチド免疫療法を試みる場合には、末梢血リンパ球に増殖応答を惹起させることが必要である。融合ペプチドで末梢血リンパ球を刺激し、増殖応答が観察されるかについて調査した。

【0063】

スギ花粉症患者または健常人由来末梢血リンパ球を10%ヒト血清を含むRPMI-1640培養液に懸濁した後、96-ウエル丸底培養プレートの各ウエルに 2.5×10^5 個/200 μl になるように播種した。図9記載の融合ペプチド、Cry j 1、Cry j 2のいずれかを、融合ペプチドが最終濃度0.001~20 $\mu\text{g/ml}$ 、Cry j 1が50 $\mu\text{g/ml}$ 、Cry j 2が2 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、6日間培養した。0.5 μCi の ^3H チミジンを添加してさらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターでガラスフィルターに捕

集した後、液体シンチレーションカウンターで ^3H チミジンの細胞内取り込みを測定した。

【0064】

患者6名の中で5名の末梢血リンパ球が融合ペプチドに対して増殖応答を示した。患者1名と健常者2名の末梢血リンパ球は増殖応答を示さなかった(図11)。

【0065】

末梢血リンパ球の増殖応答は $0.1\mu\text{g/ml}$ の融合ペプチド刺激で起こり始め、投与量に比例して増殖応答は増大した。この結果から、*in vitro*で十分なT細胞増殖応答を誘導する融合ペプチドの濃度は $10\mu\text{g/ml}$ 以上であると判断された。

【0066】

17名のスギ花粉症患者と2名の健常者由来末梢血リンパ球を $10\mu\text{g/ml}$ の融合ペプチドで刺激し、T細胞応答を算定した。健常人の末梢血リンパ球ではT細胞増殖応答能が観察されなかった。17名の患者では最高で9,652cpmの ^3H チミジンの取り込みが観察された。抗原刺激なしの末梢血リンパ球の ^3H チミジンの取り込みを1と計算し、抗原存在下の末梢血リンパ球の ^3H チミジンの取り込み値を刺激係数(SI)で表現し、結果を図12に示した。T細胞エピトープの同定の際には $\text{SI} > 2$ 以上を陽性とみなすため、同様に $\text{SI} > 2$ 以上をペプチドに対して増殖応答が観察されたとみなすことにすると、17名の患者の中で13名(76.5%)に増殖応答がみられた。この結果から、スギ花粉症患者にペプチドを投与した場合には76.5%の患者においてペプチド免疫療法の効果があると判定される。

【0067】

スギ花粉症患者に、本発明の多重エピトープペプチドでペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来末梢血リンパ球の多重エピトープペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答の見られる患者を選定することができる。この試験によって多重エピトープペプチドを用いたペプチド免疫療法がその患者に適用できるのかが判定できるし、増殖応答能の高さから治療効果についてもある程度の予測ができると考えられる。

【0068】

【実施例10】 CB6F1マウスのT細胞エピトープの同定

8週齢の雄CB6F1マウスをアジュバント (Imject Alum: ピアス社) と共に組み換えCry j 2 (rCry j 2) 10 μ gで2週間おきに3回免疫した(ip)。最終免疫から1週間後にマウス3匹から脾細胞を調製し一つにまとめた。96ウェルプレート (ファルコン) 1ウェルに対し脾細胞 (5×10^6) を15残基からなる74種類のうちのいずれかのオーバーラッピングペプチド (0.115 μ M) と共に0.2mlのRPMI培地 (10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン) で培養した。対照としてPBS、50 μ g/ml Cry j 1、0.3 μ g/ml rCry j 2のそれぞれに対する反応も検討した。各々の試験試薬に対し3ウェル播種し、37℃、5% CO₂条件下で3日間培養した。最後の6時間0.5 μ Ci/ウェルの [³H]-チミジンでパルスラベルを行いセルハーベスター (Inotek、ベルトールドジャパン株式会社) で細胞をガラスフィルター上に捕集し、乾燥した後、液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 4530、パッカードジャパン株式会社) で [³H]-チミジンの細胞内取り込みを測定した。

【0069】

rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは抗原であるrCry j 2に強い反応性を示したが、もう一つのスギ花粉主要アレルゲンであるCry j 1には反応せず、この系が抗原特異的反応であることが確認された。そして、rCry j 2で免疫したCB6F1マウスは、調べた74種類のオーバーラッピングペプチドのうち図2に示すNo.14ペプチドとNo.48ペプチドに顕著な応答性を示した。このことからCB6F1マウスにおいてNo.14とNo.48のペプチドが主要T細胞エピトープとして抗原提示に関与していることが示された。ヒトにあってもNo.14とNo.48のペプチドは主要T細胞エピトープペプチドであることから、CB6F1マウスはスギ花粉に対するペプチド免疫療法に使用するペプチドの有効性を評価するうえで有用なモデル動物になりうると判断された。

【0070】

【実施例11】 T細胞エピトープペプチドNo.14のインビボにおける免疫応答
8週齢の雄CB6F1マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mg No.14ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群 としては等容量 (100 μ l) の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプ

チド投与後5日目にインジェクトアルム(Imject Alum)と混合したrCry j 2(50 μ g)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート(ファルコン)1ウエルに対し脾細胞(5 $\times 10^6$)をrCry j 2(3 μ g/ml)と共に0.2mlのRPMI培地(10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン)で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。³H-チミジンによるT細胞増殖の測定は、実施例10に記載された方法に準じて行った。

【0071】

CB6F1マウスに予めNo.14ペプチドを皮下投与しておくとするrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された($p < 0.01$)。このことからマウスのモデル系においてNo.14ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法の予防効果を有することが示された(図13)。

【0072】

〔実施例12〕 T細胞エピトープペプチドNo.48のインビボにおける免疫応答
6週齢の雄CB6F1マウス1匹当り生理食塩水に溶解した3mg No.48ペプチドを、5日間隔で2回皮下投与した。対照群としては等容量(200 μ l)の生理食塩水を同様に投与した。ペプチド投与群及び対照群の動物数は各々8匹とし、2回目のペプチド投与から5日目にアジュバント(Imject Alum)と混合したrCry j 2(50 μ g)で全てのマウスを皮下免疫した。免疫1週間後に各々のマウスから脾細胞を調製した。96ウエルプレート(ファルコン)1ウエルに対し脾細胞(5 $\times 10^6$)をrCry j 2(3 μ g/ml)と共に0.2mlのRPMI培地(10% FCS、2mM L-グルタミン、50U/ml ペニシリン、50 μ g/ml ストレプトマイシン)で培養した。対照としてrCry j 2を含まない条件下で培養した。³H-チミジンによるT細胞増殖の測定は実施例10に記載された方法に準じて行った。

【0073】

CB6F1マウスに予めNo.48ペプチドを皮下投与しておくとするrCry j 2による抗原刺激に対し、T細胞の免疫応答性が生理食塩水投与群に比べ有意に抑制された($p < 0.05$)。このことからマウスのモデル系においてNo.48ペプチドはスギ花粉アレルギーに対しペプチド免疫療法による予防効果を有することが示された(図14)

）。

【0074】

以上の実験結果から、従来行われてきたヒトにおけるスギ花粉抽出エキスによる減感作療法がT細胞エピトープを介した作用機作であることが明らかになった。

【0075】

【発明の効果】

本発明の多重エピトープペプチドは、Cry j 1及びCry j 2の両方のT細胞エピトープペプチドを含み、かつ、スギ花粉症患者において、遺伝子頻度の高いHLA-DPB1*0501で提示されるペプチドを含み、さらには、HLAクラスII遺伝子座（DR、DQ、DP）間で異なる分子で提示されるペプチドを数個含むので、最小のペプチドの長さで、最も有効なスギ花粉症に対するペプチド免疫療法が期待できる。

【0076】

また、スギ花粉症患者に、本発明の多重エピトープペプチドを用いてペプチド免疫療法を試みる場合、前もって、患者由来の末梢血リンパ球の該ペプチドに対する増殖応答能を調査し、増殖応答が惹起される患者を選定することができる。この調査によって、ペプチドによるペプチド免疫療法がその患者に適用できるかどうかの判定が可能であり、増殖応答能の高さから、治療効果についてもある程度予測が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

Cry j 1におけるT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドの重要度指数（平均刺激係数×出現頻度）を示す図である。

【図2】

Cry j 2におけるT細胞エピトープペプチド及び当該ペプチドの重要度指数を示す図である。

【図3】

Cry j 1を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

【図4】

Cry j 2を認識するT細胞クローンのThタイプを示す図である。

【図5】

抗原ペプチドの遺伝子座レベルにおけるHLAクラスII分子の同定結果を示す図である。

【図6】

抗原ペプチドに対するHLAクラスII分子の各タイプの同定結果を示す図である。

【図7】

融合ペプチドの作製に用いたT細胞エピトープを含むペプチド配列を示す図である。図中a及びbはCry j 1のNo.43及び22のペプチドに対応し、cはCry j 2のNo.4に対応し、c及びdは、No.37-38、69-71の部分配列に対応する。

【図8】

融合ペプチドのヒトIgEとの反応性を示す図である。

【図9】

融合ペプチドのアミノ酸配列を示す図である。

【図10】

T細胞クローンによる融合ペプチドに含まれるT細胞エピトープの認識結果を示す図である。

【図11】

スギ花粉症患者と健常者の末梢血リンパ球に対する各種濃度の融合ペプチド刺激によるリンパ球増殖応答能を示す図である。

【図12】

2名の健常者17名のスギ花粉症患者の末梢血リンパ球に対する融合ペプチド刺激による増殖応答能を示す図である。

【図13】

Cry j 2のNo.14ペプチドのCB6F1マウスにおける免疫応答能を示す図である。

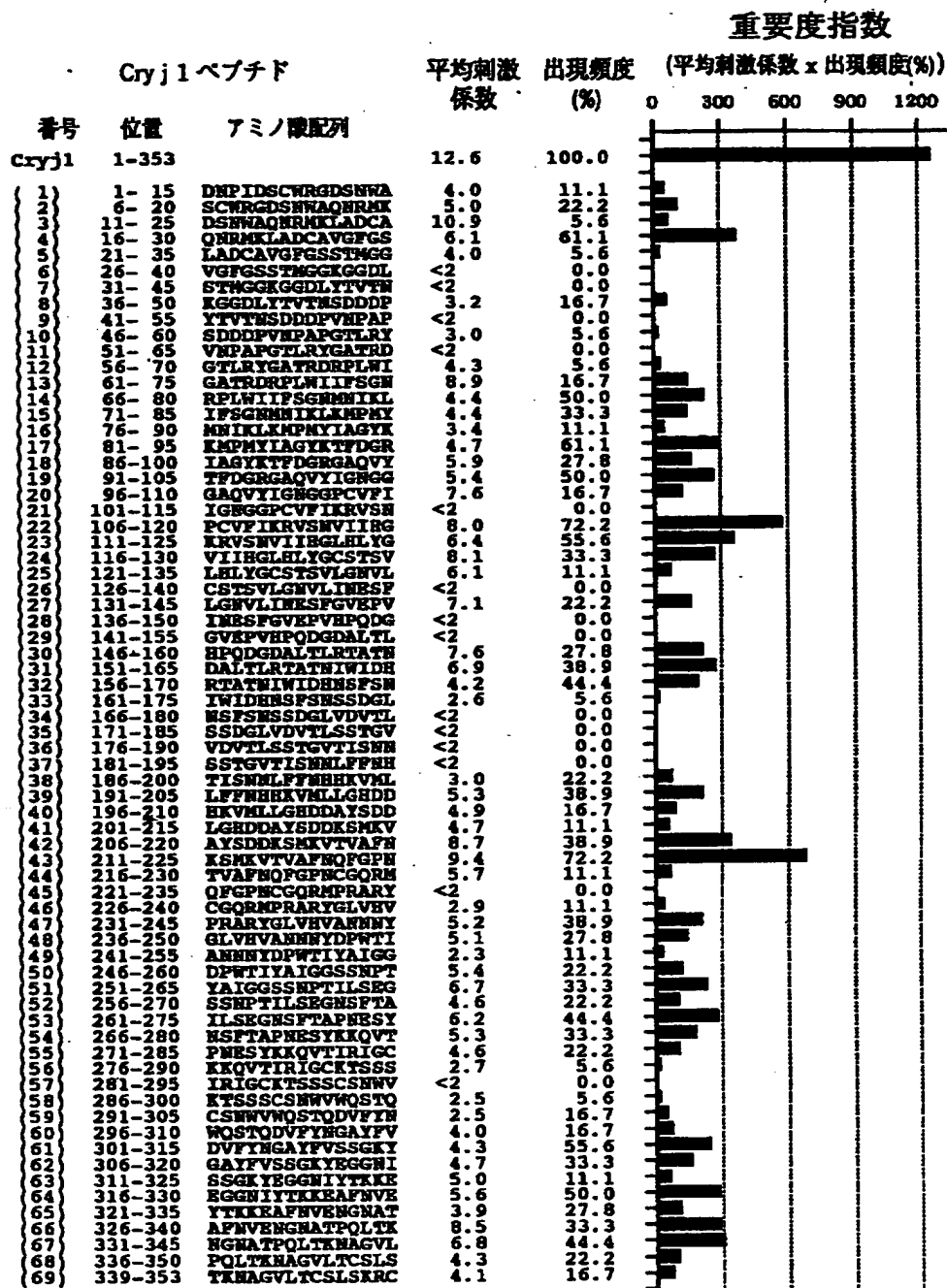
【図14】

Cry j 2のNo.48ペプチドのCB6F1マウスにおける免疫応答能を示す図である。

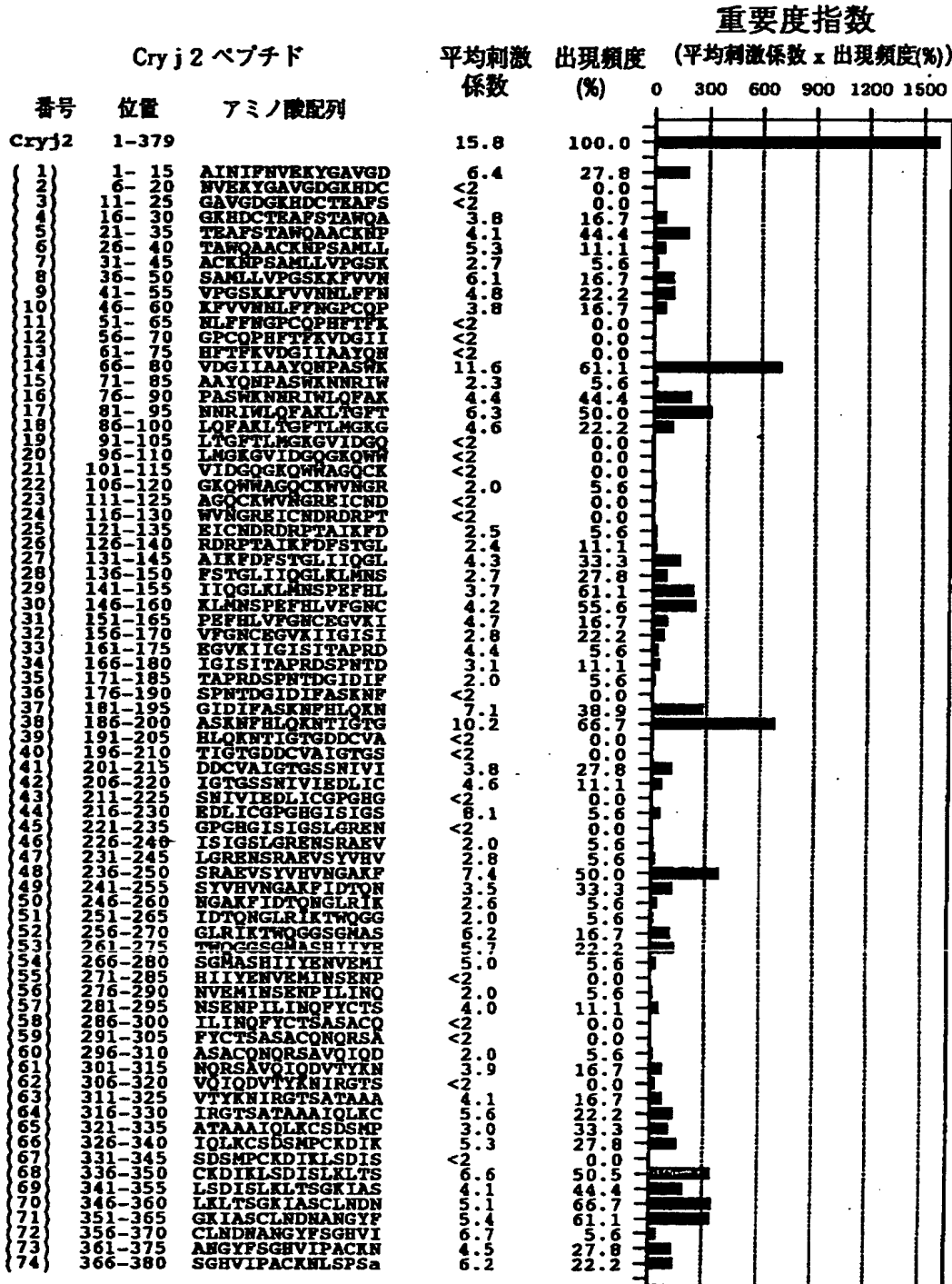
【書類名】

図面

【図1】



【図2】



【図3】

Cry j 1 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エピトープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th+ タイプ
	番号	位置		IL-2	IFN γ	IL-4	
PJ4-6	4	16-30	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	1500	334	Th0
FB8-1	4	16-30	"	<31	<31	814	Th2
FB9-37	13	61-75	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	<31	7760	Th2
FB10-24	13	61-75	"	39	151	4500	Th2
PJ1-27	19	91-105	DQ	32	1220	224	Th0
FB3-27	22	106-120	DRB5*0101	250	332	21000	Th2
FB8-2	22	106-120	"	190	2110	5709	Th0
FB8-3	22	106-120	"	<31	1270	10100	Th0
FB9-39	22	106-120	"	48	51	5120	Th2
FB10-18	22	106-120	"	410	46	7840	Th2
PJ4-29	22	106-120	"	4680	14200	6610	Th0
PJ7-9	22	106-120	"	1370	1040	12200	Th2
PJ5-6	30	145-160	DQA1*0102-DQB1*0602	1500	1170	5920	Th0
PJ5-9	30	145-160	"	1720	825	266	Th0
FB11-21	31	151-165	DRB1*0901	4190	>20000	4510	Th0
FB11-24	31	151-165	"	670	11700	1950	Th0
FB6-37	31	151-165	"	<31	<31	49	Th2
FB1-8	39	191-205	DQA1*0102-DQB1*0602	820	188	1760	Th0
FB9-34	39	191-205	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	86	1680	Th2
FB2-14	43	211-225	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	376	2320	Th0
FB7-2	43	211-225	"	84	2740	2080	Th0
FB8-32	43	211-225	"	<31	4870	1840	Th0
FB8-34	43	211-225	"	78	14800	3040	Th0
FB11-23	43	211-225	"	<31	3990	1260	Th0
FB11-26	43	211-225	"	32	1100	6520	Th0
FB4-20	43	211-225	"	<31	<31	133	Th2
FB10-4	43	211-225	"	<31	<31	4170	Th2
FB8-4	51	251-265	DQA1*0102-DQB1*0602	44	36	4050	Th2
PJ4-20	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	560	3080	<32	Th1

* IL-4/IFN γ >10 を Th2、IFN γ /IL-4 >10 を Th1 その中間を Th0 と定義する。

【図4】

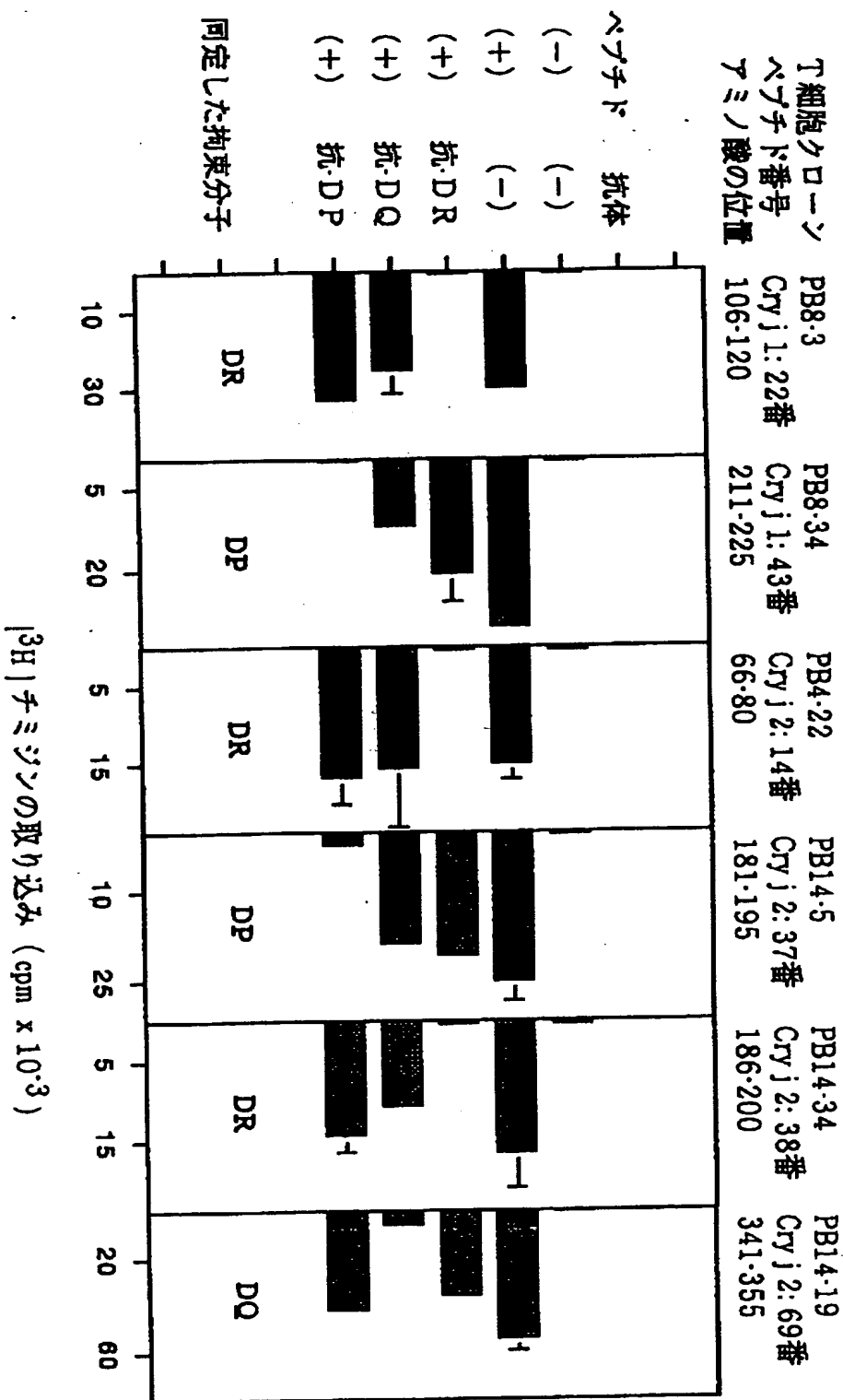
Cry j 2 を認識する T 細胞クローンの Th タイプ

T 細胞 クローン	エピトープ部位		拘束分子	リンフォカイン産生(pg/ml)			Th* タイプ
	番号	位置		IL-2	IFN γ	IL-4	
PB5-29	4	16- 30	DRB1*0901又はDRB4*0101	<31	503	97	Th0
PB11-40	4	16- 30	"	<31	<31	50	Th2
PB14-4	4	16- 30	"	<31	<31	<16	Thp
PB12-33	8	36- 50	DRB1*1501	<31	>8000	<16	Th1
PR2-25	8	36- 50	"	47	<31	977	Th2
PR5-40	8	36- 50	"	1150	1330	355	Th0
PB3-32	14	66- 80	DRB5*0101	<31	<31	323	Th2
PB4-21	14	66- 80	"	<31	109	239	Th0
PB4-22	14	66- 80	"	<31	483	158	Th0
PC1-8	14	66- 80	"	<31	2710	32	Th1
PR4-20	14	66- 80	"	<31	312	338	Th0
PR3-21	14	66- 80	"	<31	<31	338	Th2
PB13-18	17	76- 90	DPA1*0101-DPB1*0501	<31	3320	231	Th1
PB11-32	17	76- 90	"	138	60	2090	Th2
PR1-20	31	151-165	DRB1*0901	<31	<31	18	Th2
PR4-39	31	151-165	"	<31	<31	<16	Thp
PB14-5	37	181-195	DPA1*0101-DPB1*0201	87	126	469	Th0
PB14-13	37	181-195	"	<31	59	2440	Th2
PB14-34	38	186-200	DRB4*0101	186	420	93	Th0
PC3-40	38	186-200	"	<31	<31	379	Th2
PB5-3	48	236-250	DRB1*1501又はDRB5*0101	2570	>8000	525	Th1
PR2-34	65	321-335	DRB1*0901	57	1990	464	Th0
PR3-30	66	326-340	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	106	<80	Th1
PR5-18	66	326-340	"	<31	<31	<16	Thp
PC1-13	68	336-350	DPA1*0202-DPB1*0501	<31	<31	<16	Thp
PB12-8	69	341-355	DQA1*0102-DQB1*0602	<31	3210	<16	Th1
PR5-12	69	341-355	"	<31	<31	2528	Th2
PR2-31	69	341-355	"	<31	<31	332	Th2
PB14-19	70	346-360	"	<31	3730	<16	Th1
PB13-38	70	346-360	"	<31	2020	<16	Th1

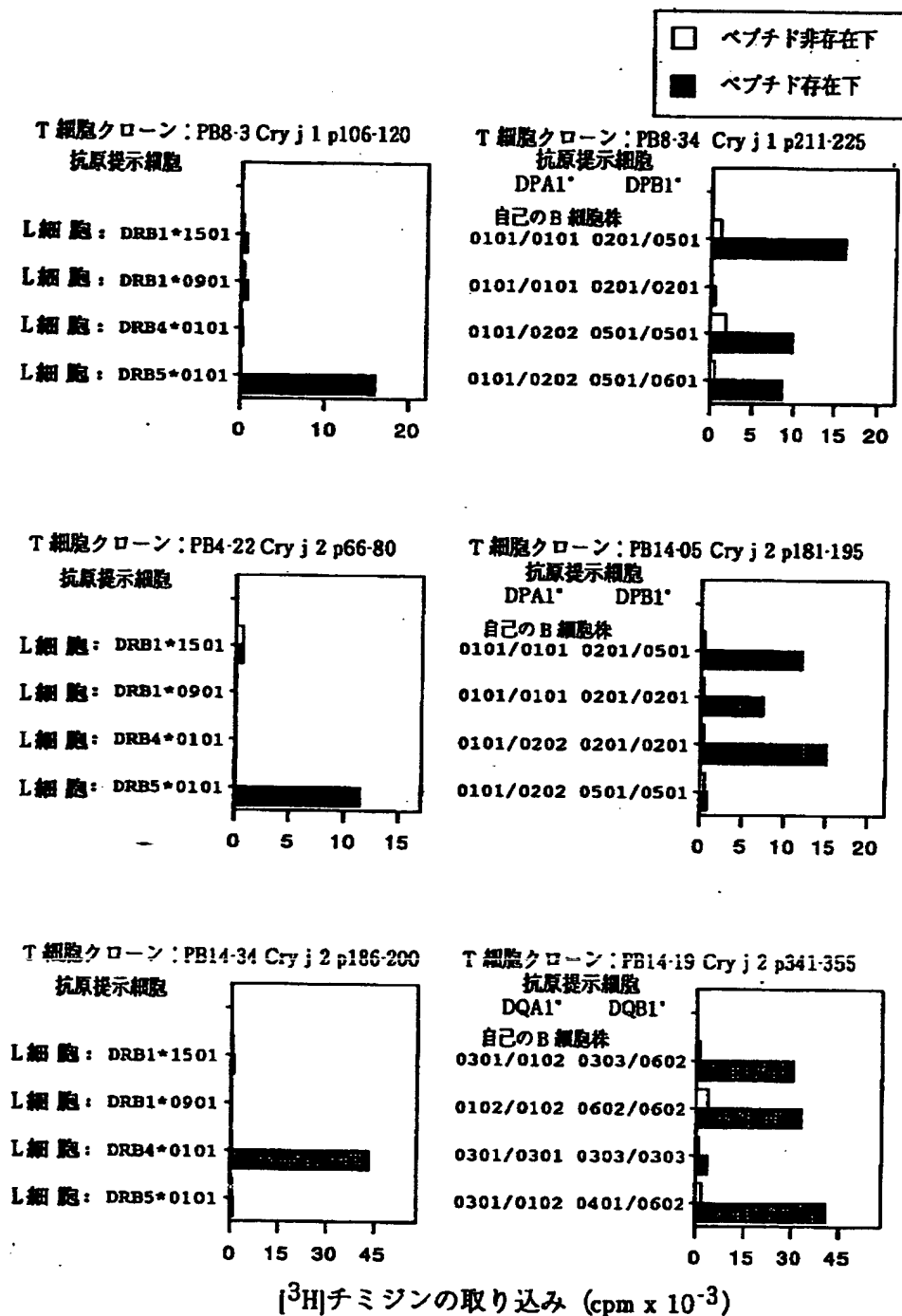
* IL-4/IFN γ >10 を Th2、IFN γ /IL-4 >10 を Th1、その中間を Th0、リンフォカイン産生が認められない場合を Thp と定義する。

特平 8-080702

【図5】



【図6】



a Lys Ser Met Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe Gly Pro Asn
b Pro Cys Val Phe Ile Lys Arg Val Ser Asn Val Ile Ile His Gly
c Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys
d Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile
Gly Thr Gly
e Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn
Gly Tyr Phe

【图7】

【図 8】

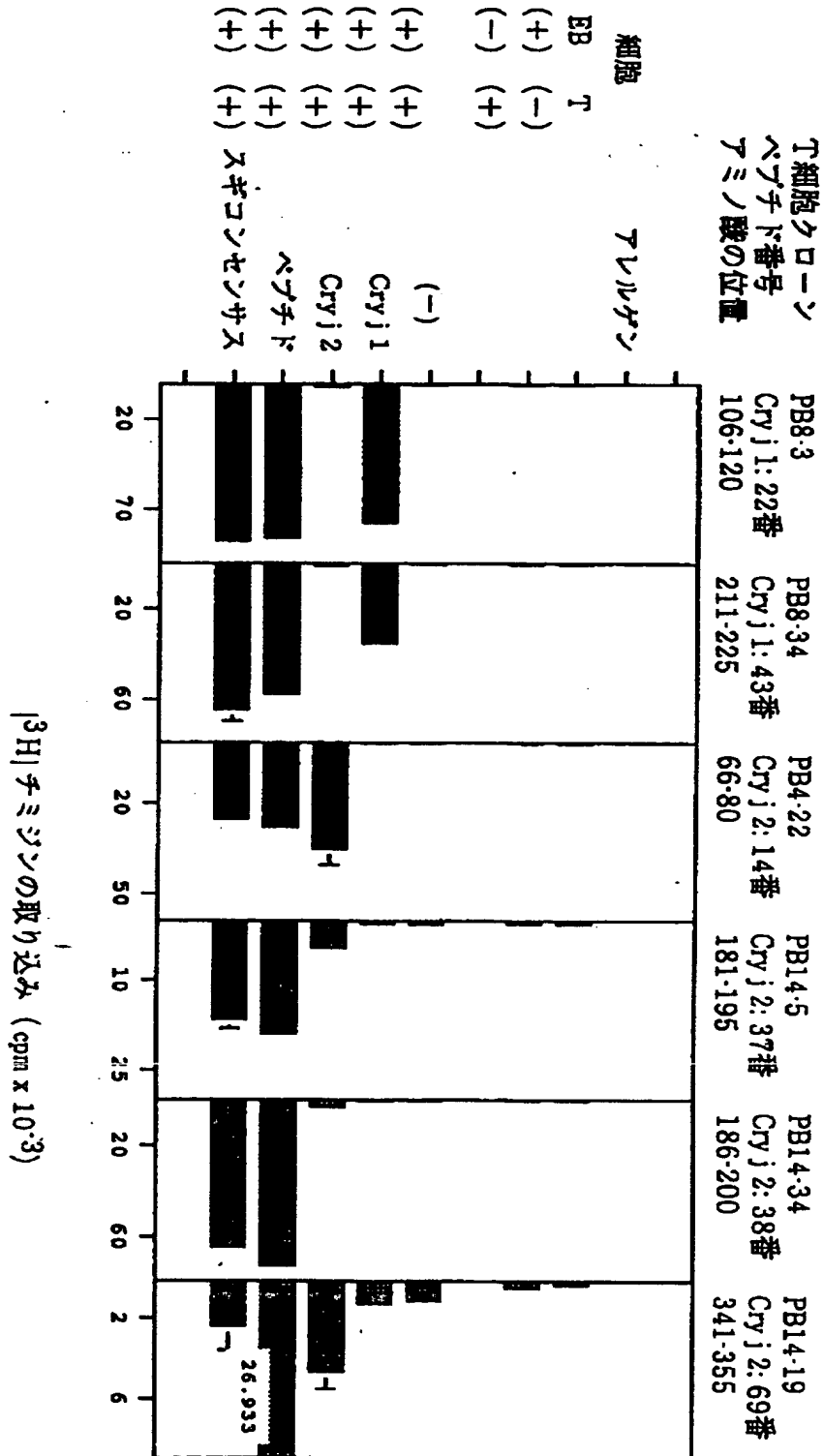
ペプチド組成物（#1～#6）のヒトIgEとの反応性

検体番号（血清）	アラング	スギ花粉抽出抗原	C.A.#1	C.A.#2	C.A.#3	C.A.#4	C.A.#5	C.A.#6
1	3	2105	5	4	3	4	4	4
2	3	1133	4	4	4	4	4	4
3	3	1126	3	3	3	4	4	3
4	3	1095	4	3	3	3	3	3
5	3	1047	3	3	3	3	3	3
6	3	1003	3	4	3	3	3	3
7	4	710	4	4	4	4	4	4
8	3	521	3	3	3	3	3	3
9	3	314	3	3	4	3	4	4
10	3	298	3	3	4	4	4	3
11	3	279	3	3	3	3	3	3
12	3	253	3	3	3	3	3	3
13	3	239	3	3	3	3	3	3
14	3	236	4	4	3	3	3	3
15	3	233	3	3	3	3	4	3
16	3	226	4	4	3	3	3	3
17	3	190	3	3	3	3	3	3
18	3	162	4	4	4	4	4	4
19	3	123	3	3	3	3	3	3
20	3	106	3	3	3	3	4	3
21	4	45	3	3	3	3	3	4
22	3	14	3	3	3	3	3	3
23	3	13	3	3	3	3	3	3
24	3	11	3	3	3	3	3	3
25	3	6	4	3	3	3	4	4
26	3	4	4	4	3	4	4	3
27	3	3	3	3	3	3	3	3
28	3	3	3	3	3	3	3	3
29	3	3	3	4	3	3	3	3
ウサギ抗ペプチド IgG	112	230	3754	3829	3769	3716	3841	3798

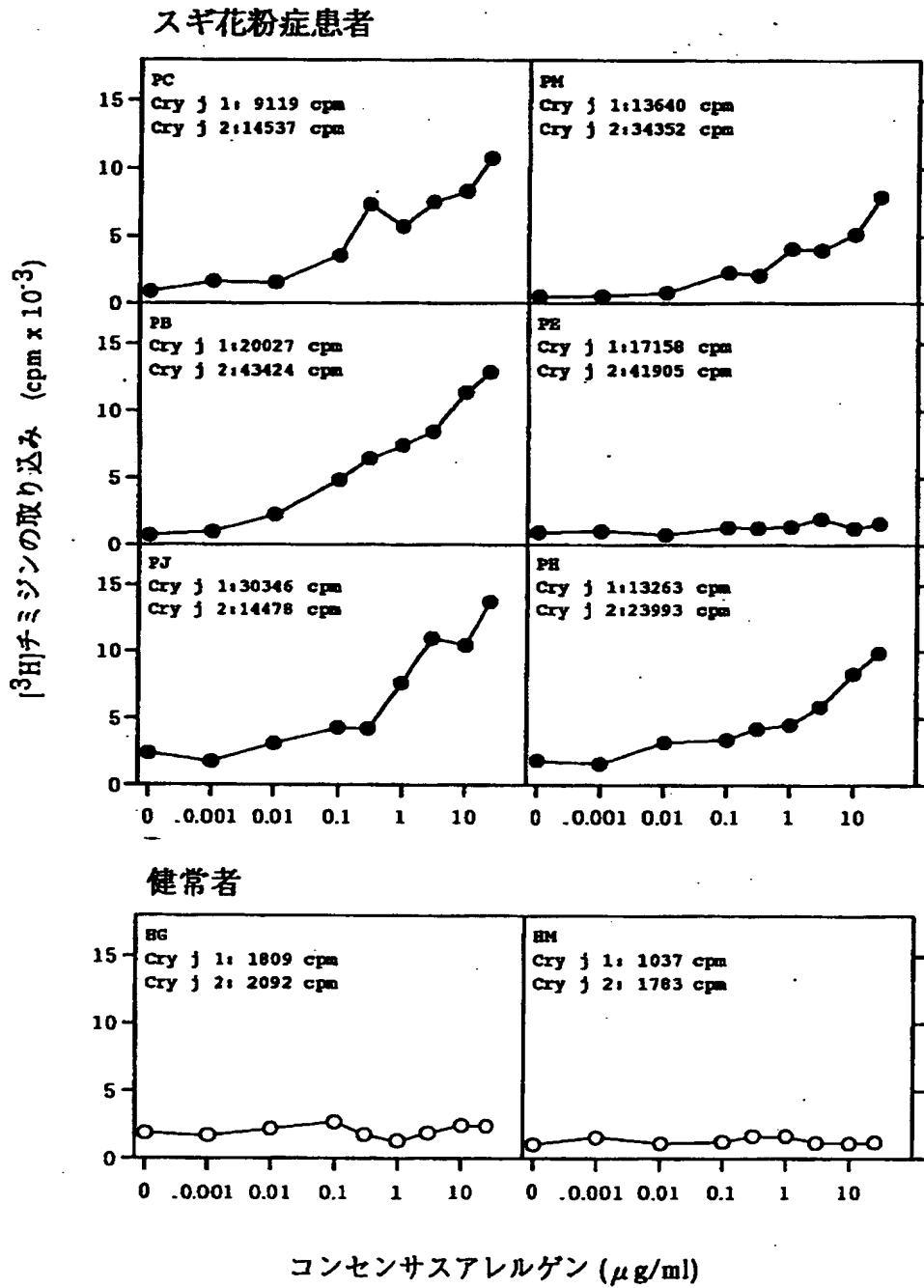
【図9】

MKVTVAFNQFGPNRR / VFIKRVSNVIHGRR / IDIFASKNFHLQKNTIGTGRR /
ISLKLTSCKIASRR / VDGIIAAYQNPASWK

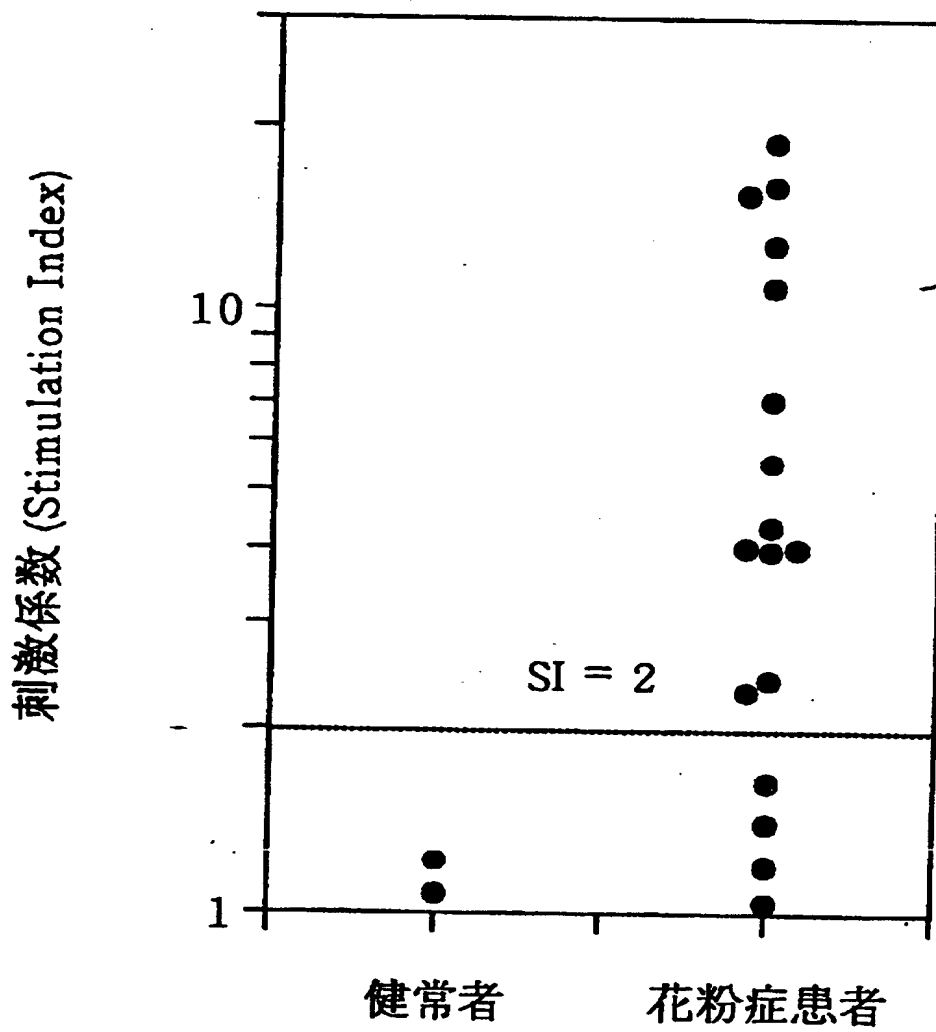
【図 10】



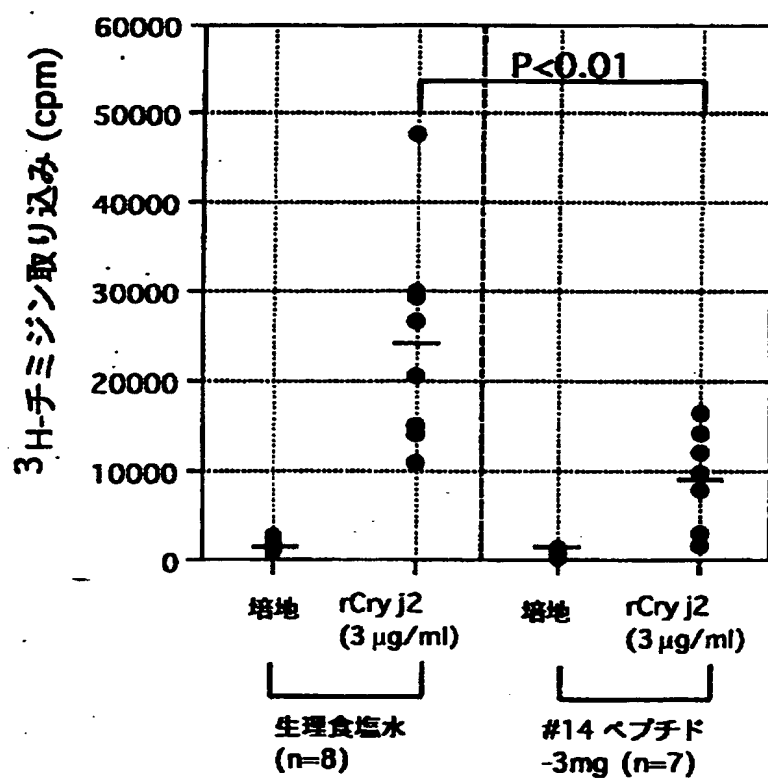
【図11】



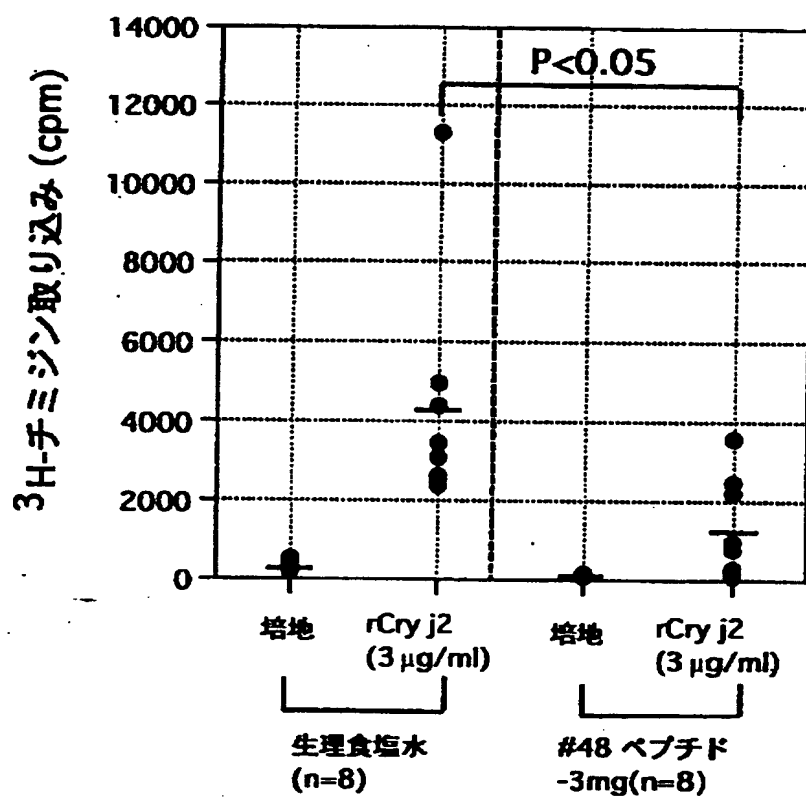
【図12】



【図13】



【図14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 スギ花粉症に対するペプチド免疫療法に有効なペプチドを提供する。

【解決手段】 スギ花粉アレルゲンCry j 1の少なくとも一つのT細胞エピトープペプチドとCry j 2の少なくとも一つのT細胞エピトープ部位とを含む多重エピトープペプチドを開発した。該ペプチドを用いることによって、有効範囲の広い、スギ花粉症に対するペプチド免疫療法が期待できる。

【選択図】 図13

特平 8-080702

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000006138
【住所又は居所】 東京都中央区京橋 2 丁目 3 番 6 号
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県つくば市千現 2-1-6 つくば研究支援セ
ンターCA-4
【氏名又は名称】 清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋2丁目3番6号
氏 名	明治乳業株式会社

